

## ヒト白血病細胞を用いたマウス subrenal capsule grafting の検討

武藤 昌図<sup>1</sup>

## Improvement of Murine Subrenal Capsule Grafting Assay Using Human Leukemia Cells

Masato Mutoh

**Abstract:**

In this study we improved the prescription of fibrin clot embedded human leukemia cells for murine subrenal capsule grafting. By pretreatment of thrombin, fibrin gel was generated tightly and better suited for grafting and evaluation. Comparison of cell-growth among immunocompetent normal mice, immunosuppressed mice and immunodeficient mice (nude mice) using this assay procedure showed normal mice was out of order for the antitumor evaluation because severe invasion of host immune cells were observed at cell-grafting site. Otherwise, leukemia cells were well proliferated without host immune response at the subrenal capsule ground in immunosuppressed mice and nude mice. In conclusion nude mice and immunosuppressed mice were right animals for antitumor activity assay by subrenal capsule grafting using fibrin-cancer cell clot.

**KEY WORDS :** Antitumor, Chemosensitivity, SRCA, Fibrin, Evaluation, Jelled-clot, Chemotherapy

**1. はじめに**

Bogden ら<sup>1)</sup>が考案した subrenal capsule assay は、比較的宿主免疫系の影響が少なく血管系が発展しているとされるマウス腎臓被膜下にヒト腫瘍を移植し、6 日間で薬物の抗腫瘍効果を判定するもので、簡易であり短期間で抗腫瘍活性を評価できることから制癌剤候補薬のスクリーニングなどに用いられてきた。最近では、マウス腎被膜下が様々な組織や細胞の移植部位として定着し、renal capsule grafting 法として確立されている<sup>2)</sup>。たとえば、上皮性幹細胞<sup>3)</sup>、リンパ節<sup>4)</sup>、膵島<sup>5)</sup>などを移植して、様々な薬理的、細胞生物学的評価が行われている。とりわけ、多彩な細胞を移植できるようになったのは、Stratton らによる培養細胞をフィブリン塊に包埋して移植するいわゆる jelled-clot 法の考案による<sup>6)</sup>。もともと彼らは、ヌードマウスなど免疫不全動物に定着せず、腫瘍塊を形成しないヒト白血病細胞を、フィブリンを支持体として移植する *in vivo* 評価系として本法を確立した。しかしながら、彼らの製法によるフィブリン塊は脆く扱いが難しかった。また、本試験系の抗

腫瘍効果判定は、実体顕微鏡下で移植片の径を測定して計算腫瘍重量を算出する事が基本であるが、ヌードマウス皮下などに形成した腫瘍塊の移植と異なりフィブリン塊が崩れやすく細胞と腎臓組織の境界が不鮮明で測定が難しいという問題点もあった。そこで、今回強固なフィブリン塊封入培養細胞を作る改良法を考案し、通常マウスと免疫抑制剤投与による免疫抑制マウスおよび免疫不全マウスであるヌードマウスでの比較を行った。培養白血病細胞を用いた *in vivo* の抗腫瘍効果評価系として本法の有用性に関して再評価を行った。

**2. 材料と方法****2.1 フィブリン塊の作成方法**

10% precolostrum newborn calf serum(三菱化成工業株式会社)添加RPMI-1640培地(日水製薬株式会社)にて安定培養しているヒト慢性骨髄性白血病 K-562細胞(癌研より供与)を用いた。総数 $10^7$  細胞以上のK-562細胞を数分間の遠心分離(4℃ 1,000 rpm)で捕集し、上清を除去した後、20% precolostrum newborn calf serum入り培地で再懸濁した。次いで10分間の遠心分離(4℃, 1,000 rpm)の後、細胞ペレットにヒトトロンビン 25 U/mlを2 ml加え、再懸濁した。再び4℃, 1,000 rpmで10分

<sup>1</sup> 湘南工科大学 工学部 人間環境学科 教授

間遠心したのち、細胞ペレットに4℃に冷却したブラスミノゲンを含むウシ血清フィブリノーゲン(SIGMA社) 10 mg/ml溶液 1 mlを加え再懸濁した。その後、すばやく4℃ 1,000 rpmで10分間遠心し、チューブごと37℃のCO2インキュベータに入れ、30分間インキュベーションした。これにより形成されたフィブリン塊を、4℃に冷却した10% dextrose添加Eagle MEM培地(日水製薬株式会社)中に取り出し、メスで約1 mm立方に切断して移植用細胞ゲルとした。

## 2.2 移植および薬剤投与

Subrenal capsule assayにおける細胞の移植法は、基本的にBogdenらの手法<sup>1)</sup>に従った。体重28g前後のBDF1 雄性マウスおよび体重22g前後のヌードマウス(BALB/c nu/nu)(日本SLC株式会社から入手)をSPF(特定病原菌除去)コンディション下で飼育し、一般状態を観察して問題ないものを使用した。尚、以下の動物実験は、実験施設の動物実験指針に従って行った。移植はペントバルビタールナトリウム(“ネンブタール注”、大日本製薬株式会社)麻酔下に行った。マウス右腎臓被膜下にベニューラ静脈留置針(19G)を用いて、1 mm立方に細断した細胞ゲルを移植した。移植時(day0)の腫瘍径を実体顕微鏡下で測定し、縫合した。効果判定用のモデル薬物(Ara-C)は、Bogdenらのレジメ<sup>1)</sup>に従い、移植翌日から5日間皮下投与した。Ara-C(日本新薬工業“キロサイド注”)は注射用生理食塩水で希釈して使用した。効果判定は移植後6日目に行った。また、ヌードマウス、免疫抑制マウス、通常マウスの比較試験はモデル薬物の投与は行わなかった。免疫抑制にはシクロフォスファミド(塩野義製薬“エンドキサン”)を注射用生理食塩水で希釈して使用した。

## 2.3 効果判定

腫瘍の計算重量(W0, W6)は、Ovejeraらの手法<sup>7)</sup>に従い、 $[(\text{長径 mm}) \times (\text{短径 mm})^2] \div 2 (\text{mg})$ にて計算し、薬物の抗腫瘍効果判定は井上らの手法<sup>8)</sup>により腫瘍増殖抑制率TGIR (tumor growth inhibition ratio)を求めた。W0は移植日の計算腫瘍重量、W6は移植後6日目の計算腫瘍重量を示す。ヌードマウスは移植後12日目にて判定したので、W12とした。

$$\text{TGIR}(\%) = [1 - (T6/T0) / (C6/C0)] \times 100$$

C0: day 0における対照群の計算腫瘍重量

C6: day 6における対照群の計算腫瘍重量

T0: day 0における薬物処置群の計算腫瘍重量

T6: day 6における薬物処置群の計算腫瘍重量

## 2.4 病理組織

作成したフィブリン塊は10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、縦軸方向に切断し、横断面で5切片を作成した。摘出した腎臓は、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋し、切片を作成後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行なった。

## 2.5 統計処理

Studentのt-testにより、統計処理を行った。

# 3. 結果

## 3.1 フィブリン塊包埋細胞の組織

2.1に示した手法で作成したフィブリン塊(切断前)をホルマリン固定し、病理切片を作成した。フィブリン塊は、作成に使用したチューブの先端部に相当する箇所やや細胞密度が高かったが、その他の部分は細胞が同程度に分散し、細胞密度に差は認められなかった(Fig. 1)。従って、フィブリン塊の先端部分を除いて切断した移植用細胞ゲルは、一定数の細胞を含んでいると判断された。

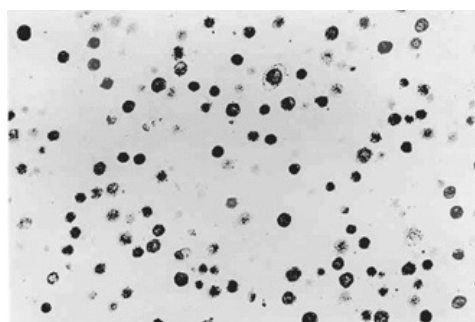


Fig.1 Distribution of human leukemia cells embedded into fibrin clot (X40)

## 3.2 通常動物を用いた腎被膜下移植法の検討

製造法を改良したフィブリン塊包埋細胞の移植による subrenal capsule assay が通常動物で成立するかどうか、BDF1 マウスの腎被膜下にヒト慢性骨髄性白血病細胞 K-562 細胞を移植して検討した。効果判定用のモデル薬物は白血病に適応を持つ Ara-C を使い、移植翌日から 5 日間皮下に連投した。判定時における対照群の計算腫瘍重量は  $9.2 \pm 0.7 \text{ mg}$  (mean  $\pm$  SE)であり、移植時の 10 倍の重量になっていた(Table 1)。Ara-C 投与群は用量依存性が認められなかったものの、どの群においても TGIR 50~

# ヒト白血病細胞を用いたマウス subrenal capsule grafting の検討 (武藤)

70%で、K-562 細胞の増殖を抑制した。特に、Ara-C 100 mg/kg 投与群では TGIR 74.2%の有意な増殖抑制が認められた ( $p<0.05$ )。

病理組織学的には対照群の移植組織には宿主単核細胞の高度な細胞浸潤が認められ、支持体として利用したフィブリン線維も残存していた。腫瘍組織はわずかに移植組織の辺縁に散在するのみであった

(Fig.2)。Ara-C を投与した群では、1 mg/kg、10 mg/kg 投与群の組織像は対照群とほぼ同様であったが、100 mg/kg 投与群では宿主の細胞浸潤はほとんど認められず、フィブリン組織も対照群に比べ多く残存しており、腫瘍細胞も他の群に比べ多く残っていた(Fig.3)。

**Table1.** Murine subrenal capsule assay using immocompetent mice (BDF1) <sup>a)</sup>

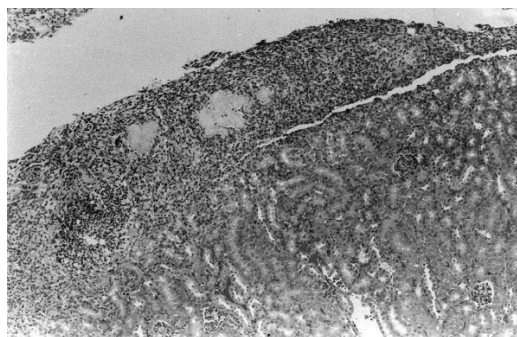
	Dose [mg/kg]	No. of animals	W0 <sup>b)</sup> [mg]	W6 <sup>c)</sup> [mg]	W6/W0	TGIR <sup>d)</sup> [%]
Control		6	1.3 $\pm$ 2.8	9.2 $\pm$ 0.7	10.1 $\pm$ 2.8	
Ara-C	1	6	1.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 1.2	64.3
	10	6	1.4 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 1.4	4.8 $\pm$ 1.3	52.3
	100	6	1.3 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 1.0	74.2

a) k-562 human leukemia cells were inoculated on Day0 and Ara-C was administered subcutaneously on QD1-5 regimen.

b) W0: calculated tumor weight on Day0

c) W6: calculated tumor weight on Day6

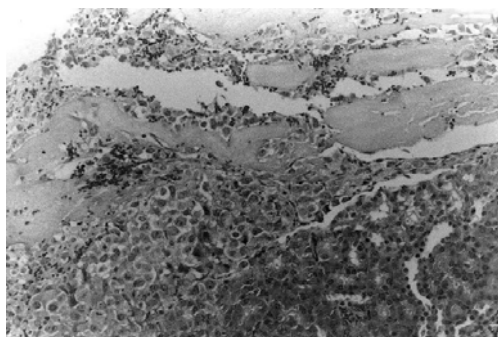
d) TGIR: Tumor growth inhibition rate: see material and method



**Fig. 2** Histological findings of control group\* (X 10)

Severe infiltration of host immune cell was found and tumor cells were not found in control group on Day6.

\*Pathological tissues were stained by hematoxylin-eosin.



**Fig.3** Histological findings of Ara-C 100 mg/kg treated group (X 40)\*

Infiltration of host cell was not found and tumor cells and fibrin basement in Ara-C 100 mg/kg treated group on Day6.

\*Pathological tissues were stained by hematoxylin-eosin.

### 3.3 免疫抑制動物および免疫不全動物を用いた腎被膜下移植の検討

前節で観察された対照群における高度な細胞浸潤を伴う病理組織学像に関して、免疫機構が正常な動物を使用したために起きたのか、非特異的な炎症反応が惹起された結果であるかを明らかにするために免疫不全マウス（ヌードマウス）およびシクロフォスファミド処理マウスでの移植片の変化に関して通常マウスを対照に検討をした。同時に、実体顕微鏡下で測定した腫瘍径から算出した計算腫瘍重量は評価に適しているかどうか、移植時と判定時の腫瘍重量比、ばらつきを検討した。通常マウスおよび免疫抑制マウスは移植後6日目に、ヌードマウスは12日目に判定した。結果をTable2. にまとめた。

通常マウスは判定時に腫瘍重量が3.4 mgとなり、移植時の4倍の重量となった。これに対し、CPM投与による免疫抑制マウスは、判定時に腫瘍重量が15.7 mgとなり、移植時の20倍となった。しかしながら、シクロフォスファミド投与マウスでは、腫瘍が被膜に沿って広がる傾向が観察された。ヌードマウスに

関しては、12日目に計算腫瘍重量が11.1 mgとなり、移植時の16倍となった。腫瘍は充実性で半球状であり、免疫抑制マウスと対照的に計測がしやすかった。ただし、ヌードマウスは比較的腎臓が小さく、被膜も薄いため移植しにくく、6匹中2匹で腫瘍脱落が認められた。

病理組織的には、通称マウスの移植部位は、ほとんど炎症性の細胞浸潤で占められ、わずかにfibrin matrixとそれに付随して少数の腫瘍細胞を残すのみで、移植組織は宿主の細胞によって置き換えられており、前節の対照群の所見と同じであった。これに対し、通所マウスに予めシクロフォスファミドを投与した群では、顕著に炎症反応が抑制され、移植部位に宿主細胞の浸潤は認められず、腫瘍細胞も充実性で腎被膜表面を被うように増殖していた。Fibrin matrixの残存も顕著であった。一方、ヌードマウスに移植した組織では、同様に宿主細胞の浸潤がなく、腫瘍の増殖は充実性であったが、腎表面から盛り上がっており、腫瘍内の血管も豊富であった(Table3)。

**Table2.** Comparison of the growth of human leukemia cells among immunocompetent, Immunosuppressed and immunodeficient mice. <sup>a)</sup>

Animals	No. of animals	W0 <sup>e)</sup> [mg]	W6(12) <sup>f)</sup> [mg]	W6(12)/W0
Immunocompetent mice <sup>b)</sup>	7	0.9 ± 0.2	3.4 ± 0.4	4.2 ± 0.6
Immunosuppressed mice <sup>c)</sup>	8	1.3 ± 0.3	15.7 ± 4.3	20.2 ± 9.0
Immunodeficient mice <sup>d)</sup>	4	0.7 ± 0.1	11.1 ± 4.3	15.8 ± 5.6

a) K-562 cells were inoculated on Day0.

b) The assay was terminated on Day6.

c) The assay was terminated on Day6 and CPM was administered subcutaneously on Day-1.

d) The assay was terminated on Day12.

e) W0: calculated tumor weight on Day0.

f) W6(12): Calculated tumor weight on Day6(12).

**Table3.** Histological findings of human leukemia cells grafting site in immunocompetent, immunosuppressed and immunodeficient mice.

Animals	Days after grafting	Histological findings	
		Cell infiltration <sup>a)</sup>	Tumor cells <sup>b)</sup>
Immunocompetent mice	6	+++	—
Immunosuppressed mice	6	—	+++
Immunodeficient mice	12	—	+++

a) Host cell infiltration +++: sever, —: No

b) +++: Cell components in grafting site were tumor cells

—: Tumor cells were not noticed or scarcely seen.

#### 4. 考 察

本報告では、培養細胞をフィブリン塊に固め、マウス腎被膜下に移植して薬物の抗腫瘍効果を判定する評価系の検討を行った。この系は、基本的に Straitton らの方法<sup>6)</sup>を改良したものである。彼らの方法では subrenal capsule assay に耐えうる硬さを持ったフィブリン塊を安定的に作成するのは難しかった。そこで、今回 clot の支持体となるフィブリンの前駆体フィブリノーゲンを cell pellet に加える前に、細胞をトロンビンで処理し、フィブリンを生成しやすくした。このトロンビン処理濃度は微妙であり、25 U/ml 以下の濃度ではゲルを固めることができず、それよりも高い濃度にするトロンビンを加えた直後に固まり、均一に細胞を分布させたゲルは得られなかった。最終的に決めた条件で作成した移植用フィブリン塊は、先端部を除き細胞が均一に分布しており、適度の硬さを有していたため、移植には適切であると思われた。

通常マウスに行った移植では、2 回の実験で増殖率 (W6/W0) に 3 倍近い差があった。これは移植する clot 中の細胞密度、細胞の状態、移植片の大きさなどに影響されたためと思われる。Ara-C の投与により細胞増殖は抑制される傾向にあったが、用量依存性は認められなかった。病理組織的には、Ara-C 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与群は、対照群と同じく高度な細胞浸潤が認められ、腫瘍細胞は殆ど残存していなかった。また、Ara-C 100 mg/kg 投与群は細胞浸潤が抑制され、腫瘍細胞が残存していた。これは、Ara-C による宿主免疫系の抑制のためと思われる。残存している腫瘍細胞は宿主反応と Ara-C の細胞毒性に耐えたものと考えられる。すなわち、計算腫瘍重量で判定した抑制効果は、細胞浸潤が抑制されたための結果か腫瘍の増殖が抑制された結果か判然としない。計算腫瘍重量として示されるのは、細胞浸潤で膨潤する体積と抗腫瘍薬によって縮小する腫瘍体積および細胞浸潤容積の和であることが推測される。

一方、ヌードマウスおよび免疫抑制マウスを用いた実験では、通常マウスとは対照的に宿主の免疫反応は少なく、腫瘍細胞も増殖していた。ヌードマウスに関しては、12 日目という長期間の増殖を観察したが、腫瘍重量は移植時の 16 倍となり、宿主免疫細胞の浸潤もほとんど見られなかった。Fingert らの報告によると<sup>9)</sup>、フィブリン塊包埋ヒト白血病細胞のマウス腎被膜下移植法は、通常マウスとシクロフォスファミドやシクロスポリンなどの免疫抑制剤を投与した免疫抑制マウスと比較すると増殖率が悪く、

移植 6 日目を境に急速に縮小した。移植した腫瘍細胞の種類により差異はあるがどの細胞も傾向は同様であり、6 日目には宿主免疫系の影響を受けていることが推測され、今回の結果と矛盾しない。6 日目の移植部位の大きさは腫瘍の増殖を反映したものであるとしても宿主免疫細胞の介入は避けられないものと考えられる。従って、通常マウスを用いたフィブリン塊包埋細胞の腎被膜下移植モデルでは、被験薬の抗腫瘍活性評価を誤る可能性が明らかとなり、適正な抗腫瘍活性の判定にはヌードマウス等の免疫不全動物または免疫抑制動物を用いるのが妥当であることが示された。

最近では、超免疫不全マウス NOD/Shi-scid-IL2R $\gamma$  null マウス (NOG マウス) などが開発され<sup>10) 11)</sup>、ヒト白血病細胞も簡易に移植できるようになったが、抗腫瘍活性物質のスクリーニングに用いるにはまだ動物の供給や価格の面から現実的でないため、本試験系は有用であると考えられる。

#### 5. 参考文献

1. Bogden AE, Cobb WR, Lepage DJ, Haskell PM, Gulkin TA, Ward A, Kelton DE, Esber HJ.: Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse: six-day subrenal capsule assay. *Cancer*. 48(1), 10-20, 1981
2. Brody J, Young P, Cunha GR.: Renal Capsule Grafting. <http://mammary.nih.gov/tools/mousework/Cunha001/index.html>, 1998
3. Eirew P, Stingl J, Eaves CJ: Quantitation of human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative properties using a subrenal capsule xenotransplantation assay. *Nat Protoc.* 5(12), 1945-56, 2010
4. Trencsenyi G, Kertai P, Bako F, Hunyadi J, Marian T, Hargitai Z, Pocsi I, Muranyi E, Hornyak L, Banfalvi G.: Renal capsule-parathyroid lymph node complex: a new in vivo metastatic model in rats. *Anticancer Res.* 29(6), 2121-6, 2009
5. Socha-Urbaneck K, Socha M, Kwaśny M, Fiedor P.: Survival of islet allografts under kidney capsule in the recipient preconditioned with or without myeloablation and treated with UVB-irradiated donor bone marrow infusion.

- Transplant Proc., 34(2), 657-8, 2002
6. Stratton JA, Micha JP, Rettenmaier MA, Braley PS, DiSaia PJ.: Chemosensitivity testing of nonsolid tumors by the subrenal-capsule implant assay. *Gynecol Oncol.*, 17(2), 185-8, 1984
  7. Ovejera AA, Houchens DP, Barker AD.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 8, 50~56, 1978
  8. 井上雅弘、王 毅、多田敦彦、植野克巳、小島和子、小川一誠：マウス腎被膜下移植法 (Subrenal Capsule Assay) による制癌剤感受性の検討。癌と化学療法, 12, 1644-50, 1985
  9. Fingert HJ, Chen Z, Mizrahi N, Gajewski WH, Bamberg MP, Kradin RL.: Rapid growth of human cancer cells in a mouse model with fibrin clot subrenal capsule assay. *Cancer Res.*, 47(14), 3824-9, 1987
  10. Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, Mantani A, Ikebe M, Miyakawa K, Moriyama M, Nakamura M, Katsuki M, Takahashi K, Yamamura K, Sugamura K.: Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*, 87(3), 956-67, 1996
  11. Zunino SJ, Storms DH, Newman JW, Pedersen TL, Keen CL, Ducore JM.: Dietary resveratrol does not delay engraftment, sensitize to vincristine or inhibit growth of high-risk acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *Int J Oncol.*, 41(6): 2207-12, 2012